

**This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

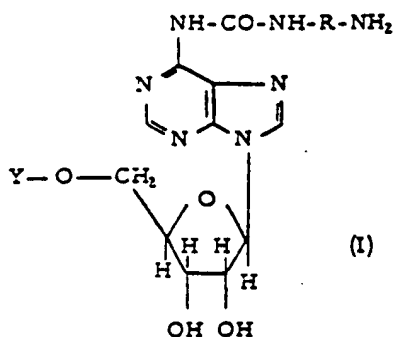
- **BLACK BORDERS**
- **TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- **FADED TEXT**
- **ILLEGIBLE TEXT**
- **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- **COLORED PHOTOS**
- **BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS**
- **GRAY SCALE DOCUMENTS**

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problems Mailbox.**

JA 0133283
NOV 1978

<p>00971B/01 B02 D16 J04 AGEN 25.04.77 AGENCY OF IND SCI TECH *J5 3133-283 25.04 77-JA-048287 (20.11.78) B01j-01/22 C08f-08/30 C08g-85 Adenine-nucleotide-bonded high molecular material - prepd. by bonding adenine-nucleotide derivs. to high molecular material through end amino gps.</p>	<p>B(4-B3, 4-B4A, 4-C3B) D(5-A) J(1-D1A, 4-B1C). 3 80</p>
<p>Adeninenucleotide-bonded high mol. wt. cmpds. formed by chemically bonding adeninenucleotide derivs. of formula (I) or salts thereof to high mol. wt. cmpds. through the end amino gps., are new.</p>	<p>(R = opt. substd. divalent hydrocarbon gp.; Y = phosphoric acid residue selected from monophosphoric acid, diphosphoric acid and triphosphoric acid).</p> <p><u>USE</u> The prods. are used as adsorbents for affinity chroma- tography or as reaction media for enzyme reactions.</p> <p><u>DETAILS</u> The adeninenucleotide derivs. of formula (I) which have not been described in the literature can be prepd. by react- ing adenosine monophosphoric acid, adenosine diphosphoric acid, or adenosine triphosphoric acid with a diisocyanate of formula NCO-R-NCO in a solvent (e.g. DMSO or DMF) at 30-100° C, cooling the reaction mixt. to room temp. or below, and pouring the reaction mixt. into a mixt. of 100 pts. wt. water and 50-200 pts. wt. of an organic solvent (e.g. benzene, hexane, ethyl acetate) maintained in acid state. The amt. of diisocyanate used is 30-200 moles per mole of adenosine phosphoric acid.</p> <p><u>EXAMPLE</u> None given. (8ppW136).</p> <p>00971B J53133283</p>



⑩日本国特許庁

⑪特許出願公開

公開特許公報

昭53-133283

①Int. Cl.²

識別記号

②日本分類

庁内整理番号

④公開 昭和53年(1978)11月20日

C 08 G 85/00

26(1) A 32

6474-45

C 08 F 8/30

13(9) F 2

6939-4A

発明の数 1

B 01 J 1/22

審査請求 有

(全 8 頁)

⑤アデニンスクレオチド誘導体を結合した高分子物質

⑥特 願 昭52-48287

⑦出 願 昭52(1977)4月25日

⑧発 明 者 山崎幸苗

千葉市稲毛東5丁目8番1号

工業技術院微生物工業技術研究

所内

同 前田英勝

千葉市稲毛東5丁目8番1号

工業技術院微生物工業技術研究

所内

⑨発 明 者 鈴木英雄

千葉市稲毛東5丁目8番1号

工業技術院微生物工業技術研究

所内

同 上林明

千葉市稲毛東5丁目8番1号

工業技術院微生物工業技術研究

所内

⑩出 願 人 工業技術院長

⑪指定代理人 工業技術院微生物工業技術研究

所長

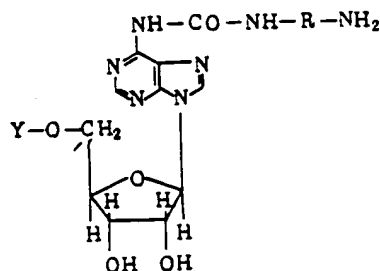
明 細 書

1. 発明の名称

アデニンスクレオチド誘導体を結合した高分子物質

2. 特許請求の範囲

(1) 一般式

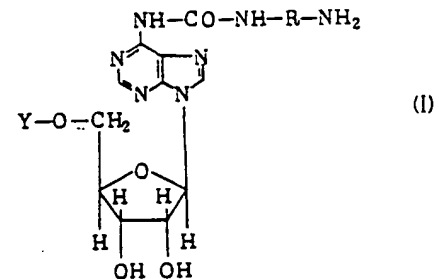


(式中、Rは置換基を含有していてもよい2価の炭化水素基であり、Yはモノリン酸、ジリン酸及びトリリン酸の中から選ばれるリン酸残基である)で表わされるアデニンスクレオチド誘導体又はその塩を、その末端アミノ基を介して高分子物質に化学結合させてなるアデニンスクレオチドを結合

した高分子物質。

3. 発明の詳細な説明

本発明は、一般式



(式中、Rは置換基を含有していてもよい2価の炭化水素基であり、Yはモノリン酸、ジリン酸及びトリリン酸の中から選ばれるリン酸残基である)

で表わされるアデニン核の6位アミノ基がカルバモイル化されたアデニンスクレオチド誘導体又はその塩を、その末端アミノ基を介して高分子物質に化学結合させてなるアデニンスクレオチドを結合した高分子物質に関するものである。

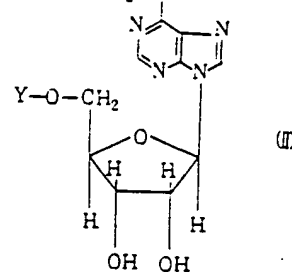
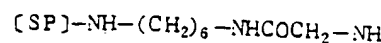
本発明による物質は新規であり、そのリガンド

として結合する前記式(I)で表わされるアデニンスクレオチド誘導体の作用により、アフィニティクマトグラフィーの吸着体や、酵素反応における反応媒体などとして利用される。

酵素工業において、必要な酵素の分離精製に用いる、いわゆる、アフィニティクマトグラフィーの吸着体や、酵素反応における反応媒体などとして、アデニンスクレオチドを結合させた高分子物質の開発は強く要望されているが、従来提案されているものは、いずれも、その調製に著しい困難が伴ったり、目的物の収率が良くなかったり、さらに実際の使用に際し、酵素に対する親和性が極端に低かったり、あるいは結合されたアデニンスクレオチドが使用中に容易に脱離するなどの欠点があり、未だ満足すべきものは得られていない。たとえば、従来提案されているアデニンスクレオチド誘導体をリガンドとして結合した高分子物質の中で、前記した目的に最も適合したものといわれている例として次の式で表わされるものが知られている〔M. Lindberg et al., Eur. J. Biochem.

53, 481 (1975)〕。

特開 2653-13283



(式中、Yはモノリン酸、ジリン酸又はトリリン酸であり、〔SP〕はセファロースを表わす)

この高分子物質は各種のキナーゼに対して良好な親和性を示し、実際の使用条件で安定であるという特徴を有するものの、その調製は著しく困難であり、リガンドとして高分子物質に結合させるアデニンスクレオチドのN⁶-[(6-アミノヘキシル)カルバモイルメチル]誘導体を調製するのに、数段階を要し、その1つの反応段階においては反応の完結に5日以上という長期間を要し、とうてい実用性あるものといふことができない。

- 3 -

本発明者らは、使用特性にすぐれしかも調製の容易なものを開発すべく鋭意研究を重ねた結果、前記一般式(I)で表わされるアデニンスクレオチド誘導体をリガンドとして含む高分子物質がこの目的に適合することを見出し、本発明を完成するに至った。

本発明において、高分子物質にリガンドとして結合させる前記一般式(I)で表わされるアデニンスクレオチド誘導体は文献未載の新規化合物であり、以下に示すようにして製造される。なお、前記一般式において、2個炭化水素基Rの具体例としては、エチレン、プロピレン、ブチレン、アミレン、ヘキシル、ヘプタレン、オクタレン、ドデシルなどのC₂~C₂₀、好ましくはC₄~C₈のアルキレン、ブテニレン、ヘキセニレン、ドデセニレンなどのC₄~C₂₀、好ましくはC₄~C₁₂のアルケニレン、フェニレン、キシリレンなどのアリーレン基などがあり、これらは塩素、臭素、ヨウ素などのハロゲン原子、メトキシなどのアルコキシ、アセチル、アクリロイルなどのアシル基、アセト

- 4 -

キシなどのアルコキシカルボニル及びニトロ基などの置換基により置換されていてもよい。これらの塩としては、たとえば、ナトリウム塩、カリウム塩、リチウム塩などのアルカリ金属塩、バリウム塩などのアルカリ土金属塩、アルミニウム塩などの他の金属塩の他、アンモニウム塩などが挙げられる。

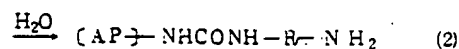
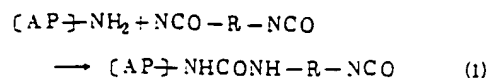
前記一般式(I)で表わされるアデニンスクレオチド誘導体を製造するには、まず、対応するAMP、ADP又はATPを原料とし、これを溶媒中において、ジイソシアネート(NCO-R-NCO)(式中、Rは前記と同じ)と反応させる。この場合、反応温度は30~100℃、好ましくは50~80℃であり、溶媒としてはヘキサメチルホスホルアミド、ジメチルスルホキシド、ジメチルホルムアミドなどの出発物質を溶解し、かつジイソシアネートと反応しない不活性のものが用いられる。原料アデノシンリン酸1モルに対するジイソシアネートの使用量は、化学量論的には1モルであればよいが、一般には、30~200モルの割合であ

度。この割合は反応温度及びジイソシアネートの反応性の強さにより、できる限りジイソシアネートの少量で反応を行うのがよいが、一般には大過剰が必要である。

次に、この反応の終了後、室温又はそれ以下の温度通常10〜0℃に冷却しながら、pH 3以下、好ましくは1〜2のアデニンスクレオチドが分解せずかつ残存するイソシアネートの反応によるゲル化が起らないpH範囲に調整した酸性条件の水と有機溶媒との混合系に添加する。この場合の溶媒としては水に対して非混和性を示すが、イソシアネートに対しては不活性でかつ混和性を示すもの、たとえばベンゼン、ヘキサンなどの炭化水素、クロロホルムなどのハロゲン化炭化水素、酢酸エチルなどの他、エーテル、ケトンなどがある。この有機溶媒は水100重量部に対し50〜200重量部である。この混合液の量は、前記反応液1重量部に対し、5〜100重量部、好ましくは20〜40重量部である。

このようにして、原料化合物であるAMP,

ADP及びATPにおけるアデニン核の6位のアミノ基が末端にアミノ基を有するカルバモイル基でカルバモイル化された化合物を得る。この場合の反応は次の式で表わされる。



(式中、[AP]はアデノシンリン酸残基を表わす)

本発明の反応を行なう場合、目的物を収率よく得るには、反応(2)で示される加水分解反応をすみやかに行うことが必要である。反応系に単に水を加えるのみでは、系全体がゲル状になってしまう。このような不都合を回避するには、可及的低温において、酸性水と非水溶性の有機溶媒との混合系をばけしくかきまぜながら、この混合系に反応(1)で得た反応液を添加する。

本発明の反応において、有利なことには、原料としてADPを用いる場合、生成物としては、そ

- 7 -

の目的とするADP誘導体の他に、これとほぼ等量のAMP及びATPの誘導体がそれぞれ得られることである。ATP誘導体の製造が一般に困難であることを考えると、本発明によりADPを原料としてATP誘導体を容易に製造し得るのは工業的に大きな意義がある。

本発明においては、このようにして得られたアデニンスクレオチド誘導体を、その末端アミノ基の反応性を利用して種々の高分子物質に化学的に結合させる。この場合の高分子物質としては、水溶性、非水溶性を問わず、各種のものが適用され、その具体例としては次のようなものを挙げる事ができる。

(A) 水酸基を有する高分子物質：たとえば、アガロース、デンプン、セルロース、デキストランなど。

(B) カルボキシル基を有する高分子物質：たとえば、ポリアクリル酸、ポリメタクリル酸、カルボキシメチルセルロースなど。

(C) エポキシ基を有する高分子物質：たとえば、

- 8 -

ポリグリシジルメタクリレートなど。

(D) メチロール基を有する高分子物質：たとえば、ポリN-メチロールアクリルアミドなど。

(E) 各種のポリアミン：たとえば、ポリリジン、ポリエチレンジイミンなど。

高分子物質に対する前記アデニンスクレオチド誘導体の結合は、高分子物質が水酸基を有する場合、ブロムシアン法(BrCN法)により、また高分子物質がカルボキシル基を有する場合、カルボジイミド法などにより、エポキシ基を有する場合にはアルカリ性でのカップリングにより、またメチロール基を有する高分子物質に対しては酸触媒での加熱反応により行うことができる。また、他の結合法としては、アデニンスクレオチド誘導体の末端アミノ基に無水コハク酸などの活性なジカルボン酸を反応させてカルボキシル基を導入し、この導入カルボキシル基を用いてアミノ基や水酸基を有する高分子物質に結合させることができるし、さらにその末端アミノ基にアクリロイル基などの重合性官能基を導入し、これを他のモノマーと共

重合させることにより高分子化することもできる。
いずれにしても、このような高分子物質に対する
アデニンスクレオチド誘導体の結合は、慣用の反
応手段により行うことができる。

本発明による前記アデニンスクレオチド誘導体
を結合した物質は、その合成は著しく容易であり、
しかも通常の使用条件下ではその N^6 -カルバモイ
ル結合が極めて安定で、結合したアデニンスクレ
オチド誘導体が遊離するようなことはなく、さ
に、関係酵素に対し強い親和力を有し、たとえ
アフィニティクロマトグラフィーの吸着体とし
て使用した場合、各種のキナーゼやデヒドロゲナー
ゼの分離に顕著な効果を示す。また、固定化補酵
素として酵素反応器（バイオリクター）に対し
て応用する場合、各種のキナーゼに対して高い補
酵素活性を示す。

次に本発明を実施例によりさらに詳細に説明す
る。

実施例

A：アデニンスクレオチド誘導体の合成

MLiCl₂ 溶液 (pH 5) 1 g と 0.2 M LiCl₂ (pH 2)
1 g の 2 液による直線勾配溶出法によった。
500 ml から 800 ml までの溶出液を合せ、1 N
LiOH で pH 7 に調整し、これを濃縮後、エタノ
ールとアセトンの 1:1 混合液をこの濃縮液に加
えて白色沈殿を形成し、これを遠心分離し、減圧
乾燥して、 N^6 -(N-(6-アミノヘキシル)カル
バモイル)-AMP・Li 塩の 1 水和物(A) 0.39
g を白色粉末として得た。次に、この Li 塩の一
部を水に溶かし、酸性として白色沈殿を生成
させ、これを遠心分離し、減圧乾燥して遊離酸の
1 水和物(B)を白色粉末として得た。

前記のようにして得た化合物(A)及び(B)は、薄層
クロマトグラフィー(TLC)において単一スポ
ットを示し、又高速液体クロマトグラフィー(H
SLC)において単一ピークを示し、単一物質で
あると認められた。第 1 表にその R_f 値と、保持
時間をまとめて示す。化合物(B)は LiOH で中和
した後分析にかけたため、化合物(A)の場合と同じ
値を示した。また、第 1 表には参考のために出発

特開 昭 53-133283 (4) A-(1) N^6 -(N-(6-アミノヘキシル)カル バモイル)-AMP・Li 塩の合成

アデノシン 5'-モノホスフェート (AMP) 2
g を 50 ml のヘキサメチルホスホルアミド (HMPA)
に溶解させ、これにヘキサメチレンジイソ
シアネート (HDC) 1.7 ml を加え、70℃で 2
時間反応させた。次に、この反応混液を、pH 1
の塩酸性の水 750 ml とクロロホルム 750 ml
の混合物に、氷冷下、激しくかきまぜながら、注
加した。反応液を分液コートに移し、室温で一晩
放置したのち、水層を取り、クロロホルム層は再
度 pH 1 の塩酸性の水で抽出した。両者の水層
を合せ、1 N の LiOH で pH 7 とし、ニボレー
タにより 40℃で濃縮した。約 100 ml に濃縮し
た液に、氷冷下、エタノールとアセトンの 1:1
混合液約 1 g を加えると、白色沈殿が生成した。
この沈殿を遠心分離により集め、減圧下乾燥した。
得られた固形物を再度水に溶解させ、Dowex 1
× 2 (Cl⁻) を吸着体とするイオン交換クロマトグ
ラフィーで精製した。この場合の溶出は、0.05

- 物質である AMP についての値も合せて示した。
なお、表中に示した展開溶媒は次の通りである。
- a ; イソ酪酸 : 1 M アンモニア水 (5:3)
(EDTA で飽和させた)
 - b ; 0.1 M リン酸カリウム (pH 6.8) : 硫酸ア
ンモニウム : 1-プロパノール [100:
60:2 (V/W/V)]
 - c ; 2 M 乳酸 : 0.5 M LiCl₂ (1:1)
 - d ; 1 M LiCl₂
 - e ; 2 M 乳酸 : 2 M LiCl₂ (2:1)
 - f ; 3% 乳酸 : 3 M LiCl (2:1)

第 1 表

TLCの吸着体	TLC (R f)						HSLC 保持時間 (分)
	セルロースF		PEI-セルロースF				
	a	b	c	d	e	f	
TLCの展開溶媒							
化合物A又はB	0.63	0.15	0.86	0.85	0.43	0.67	1.1
A M P	0.43	0.26	0.83	0.54	0.21	0.32	3.1

- 15 -

イル]-ATP・Li塩の合成法

アデノシンタージリン酸(ADP) 1gを50mlのHMPAに溶解させ、これにH₂O 20mlを加え、75℃で1.5時間反応させた。反応液を第1表の場合と同様にして処理して、N⁶-(6-アミノヘキシル)カルバモイル]-ADP・Li塩(イオン交換クロマトグラフィーにおける1000ml~1200ml溶出分、化合物C) 0.19g及びN⁶-(N-(6-アミノヘキシル)カルバモイル)-ATP・Li塩(イオン交換クロマトグラフィーにおける1600ml~1900ml溶出分、化合物D) 0.26gをそれぞれ白色粉末として得た。

これらの化合物C及びDについて、前記A-(1)の場合と同様にしてTLC及びHSLC分析の結果を第2表に示す。

第 2 表

TLCの吸着体	TLC (R f)							HSLC 保持時間 (分)
	セルロースF		P E I - セ ル ロ ー ス F					
	a	b	c	d	e	f	g*	
TLCの展開溶媒								
化 合 物 C	0.51	0.24	0.69	0.56	0.18	0.43	0.62	5.8
化 合 物 D	0.41	0.37	0.19	0.30	—	0.19	0.34	10.6
A D P	0.31	0.31	0.55	0.31	0.06	0.18	0.28	7.9
A T P	0.22	0.37	0.13	0.16	—	0.06	0.11	12.8

* 4分間酸-4MLiCl₂(2:1)

特開 昭53-133283(5)

また、化合物(A)、(B)はいずれも不定形固体であって明瞭な融点を示さないが、分解点としては、化合物(A)は215~225℃、化合物(B)は192~195℃の値を示し、また化合物(A)の旋光度は $[\alpha]_D^{13} = -29.7^\circ$ (C=0.74, H₂O)を示した。

化合物(A)及び(B)の元素分析値はそれぞれ理論値と一致することが確認された。さらに、官能基分析により、化合物(A)及び(B)は分子内に1つのアミノ基を持つことが確認された。

さらに、C¹³核磁気共鳴スペクトルにおいて、化合物(A)は26.5 ppmから41.3 ppmの間に6本のシグナルを示す。このことから分子内にヘキサメチレン基の存在することが確認された。また、化合物(A)及び(B)のUVスペクトルから、分子内にアデニン核の6位のアミノ基に結合したカルバモイル基の存在が確認された。

A-(2) N⁶-(N-(6-アミノヘキシル)カルバモイル)-ADP・Li塩 及び N⁶-(N-(6-アミノヘキシル)カルバモ

- 16 -

化合物(C)及び(D)はいずれも不定形固体であって
 明瞭な融点を示さないが、化合物(C)は220℃以
 上で、化合物(D)は225℃以上で分解し、また、
 旋光度については、化合物(C)は $[\alpha]_D^{13} = -2.1^\circ$
 $(C=0.82, H_2O)$ 、化合物(D)は $[\alpha]_D^{13} =$
 $-7.2^\circ (C=1.69, H_2O)$ を示した。

また、ADPとATPについては、その末端の
 リン酸無水物結合が希酸中で加熱処理すること
 により切断され、いずれもAMPに移行することが
 知られているが、このようにして化合物(C)及び(D)
 を処理すべく、それぞれを水に溶かしてpH3と
 し、100℃で5時間処理したのち、得られた生
 成物をイオン交換クロマトグラフィーで精製分離
 し、ギ酸酸性での沈殿を取り、これを集めて減圧
 乾燥して白色固形物を得た。化合物(C)及び化合物
 (D)から得られた生成物はいずれも化合物(B)と同
 であることが、TLCとIRスペクトルにより確
 認された。また、リン分析の結果、化合物(C)は分
 子内にリン2原子を持ち、化合物(D)は分子内にリ
 ン3原子を持つことが示された。

- 19 -

0.1Mの $NaHCO_3$ 5.0 mlで洗い、洗液は吸引口過
 により除去した。なお、以上の操作は全て氷冷下
 で行なった。

次に、このようにしてBrCNで活性化されたセ
 ファロース4Bゲルを、前記A-(1)で得られた
 $N^6-[N-(6-アミノヘキシル)カルバモイル]$
 $-AMP \cdot Li$ 塩20mgを4mlの0.1M $NaHCO_3$
 に溶かした溶液に加え、4℃で15時間かきま
 ながら反応させた。次いで、これを吸引口過し
 集めたのち、水、1M $NaCl$ 及び水の順で十
 分よく洗浄し、吸引口過して湿潤ゲル約4gを得た。
 リン分析の結果、このゲル中には、活性成分とし
 ての $N^6-[N-(6-アミノヘキシル)カルバモ$
 $イル]-AMP$ が、湿潤ゲル1g当たり、 $1.81 \mu mol$
 の割合で結合されていることが確認された。(以
 下、このものはセファロース4B固定化AMPと
 呼称する)

B-(2) セファロース4Bに対する $N^6-[N-(6-ア$
 $ミノヘキシル)カルバモイル]-A$
 DP 及び $N^6-[N-(6-アミノヘキ$

- 21 -

特開 昭53-133281

また、化合物(C)及び(D)はUVスペクトル分析か
 らカルバモイル基の存在が確認され、又核磁気共
 鳴分析によりヘキサメチレン基の存在が確認され
 た。さらに、化合物(C)はビルビン酸キナーゼとア
 セテートキナーゼに対してADPとしての補酵素
 活性を示し、化合物(D)はヘキソキナーゼ、グリセ
 ロキナーゼに対してATPとしての補酵素活性を示
 した。その活性の割合は元のADP又はATPと
 比較すると、最大速度においてそれぞれ20及び
 82、63及び87%であった。

B: 高分子物質に対するアデニンスクレオ
 ド誘導体の結合
 B-(1) 市販のアガロースゲルであるセファロ
 スに対する $N^6-[N-(6-アミノヘキ$
 $シル)カルバモイル]-AMP$ の結合

4gのセファロース4Bを水6mlに懸濁し、
 0.5NのNaOHでpH11とし、これに6mlの水
 に溶かしたBrCN 120mgを加えた。pHの低下
 を補なうように0.5NのNaOHを加えpH10に
 15分保った後、吸引口過し、得られた固形物を

- 20 -

ル)カルバモイル]-ATPの結合

前記B-(1)において、原料として $N^6-[N-(6-ア$
 $ミノヘキシル)カルバモイル]-ADP$ 及び
 $N^6-[N-(6-アミノヘキシル)カルバモイル]$
 $-ATP$ の各々のLi塩を用いた以外は同様にし
 て反応を行ない、セファロース4B固定化ADP
 (活性成分含量 $1.01 \mu mol/1g$ 湿潤ゲル)及び
 セファロース4B固定化ATP(活性成分含量
 $0.67 \mu mol/1g$ 湿潤ゲル)をそれぞれ得た。

B-(3) デキストランに対する $N^6-[N-(6-ア$
 $ミノヘキシル)カルバモイル]-A$
 T
 P の結合

可溶性デキストラン(デキストランT40)の
 100mgを3mlの水に溶かし、0.5N NaOHで
 pH11とし、これにBrCN 100mgを水2mlに
 溶かした溶液の0.4mlを加え、0.5N NaOHを加
 えてpH11に保った。約15分後、pHの低下
 がなくなり、この時点で0.1NのHClによりpH
 9.5に調整したのち、 $N^6-[N-(6-アミノ$
 $ヘキシル)カルバモイル]-ATP \cdot Li$ 塩20mg

- 22 -

- 478 -

を含む水溶液 1 ml を加え、これをかきまぜながら 16 時間室温に放置した。次いで 0.2 M エタノールアミン塩酸塩 (pH 8.5) 1 ml を加えて 1 時間放置したのち、BioGel P-6 のカラムでゲルクロマトグラフィーを行ない、その高分子分画を集め、さらにこれを 0.1 M トリエタノールアミン緩衝液 (pH 7.6) に対して一夜透析した。透析内液のリン分析の結果、デキストラン 1 g あたり 10.2 μ mol の ATP が結合した可溶性デキストラン固定化 ATP が得られたことが確認された。

B-(1) ポリアクリル酸に対する N^6 -(N-(6-アミノヘキシル)カルバモイル)-ATP の結合

—ポリアクリル酸 100 ㎎ を水 3 ml に溶かし、0.5 N NaOH で pH 4 とし、これにエチルジメチルアミノプロピルカルボジイミド塩酸塩 200 ㎎ を加え、直ちに N^6 -(N-(6-アミノヘキシル)カルバモイル)-ATP の Li 塩 20 ㎎ を水 0.5 ml に溶かして加え、かきまぜながら一夜 40 °C で放置した。この反応液を前記 B-(3) の場合と同様

にゲルろ過と透析処理により精製した。透析内液のリン分析の結果、ポリアクリル酸 1 g あたり 50 μ mol の ATP を結合したポリアクリル酸固定化 ATP が得られたことが確認された。

C: 応用例

C-(1) 吸着体としての応用

前記 B-(1) で調製したセファロース 4 B 固定化 AMP の湿潤ゲル 5 g をカラムに詰め (カラムベッド容量 6.5 ml) 25 mM トリエタノールアミン緩衝液 (pH 7.6) を十分に流して平衡後、アルコールデヒドロゲナーゼ (ADH)、乳酸デヒドロゲナーゼ (LDH)、ピルビン酸キナーゼ (PK)、ヘキソキナーゼ (HK)、3-ホスホグリセリン酸キナーゼ (PGK) の各々 4.2, 2.9, 3.6, 2.7, 4.9 (ユニット) と、血清アルブミン 3 ㎎ を含む液 0.2 ml をカラム上部より加え、まず、上記緩衝液に 1 mM に よる よう にメルカプトエタノールを加えた液を 50 ml 流し、次いでこのメルカプトエタノールを加えた上記緩衝液にさらに 1 M になるよう KCl を加えた液と加えない液

- 23 -

による直線勾配溶出を行なった (各液 60 ml づつ)。溶離液を 4.8 ml づつコレクターで分画し、各フラクション中の血清アルブミン濃度を 280 m μ 吸光度で測定し、また各酵素の活性を測定した。その結果、アルブミンと HK はフラクション 6 に溶出され、LDH はフラクション 6 の前後、PGK はフラクション 18 と 19、PK はフラクション 18 と 19、ADH はフラクション 23 と 24 に溶出された。

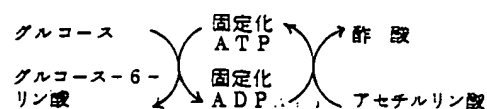
同様に B-(2) で調製したセファロース 4 B 固定化 ADP とセファロース 4 B 固定化 ATP をそれぞれ吸着体としての実験を行なって、いずれのカラムでも HK, LDH, PK, PGK, ADH が相互によく分離することを確認した。

C-(2) 固定化補酵素としての応用

前記 B-(3) で調製した可溶性デキストラン固定化 ATP はヘキソキナーゼ及びグリセロキナーゼに対して未修飾の ATP のそれぞれ 4.9 及び 7.0 分の活性を示した。更に、アセテートキナーゼ (AK) とヘキソキナーゼ (HK) の共役酵素反応

- 24 -

系において次の反応の媒体として作用した。



この共役酵素反応系におけるこの固定化 ATP の回転数 (ATP 型と ADP 型のリサイクル) はその濃度が 0.1 mM において 7.5 cycles/hr であり、一方、未修飾の ATP は同濃度において 38.2 cycles/hr の回転数を示した。

次に、AK (1.8 ユニット)、HK (8 ユニット) 及びこの固定化 ATP (0.1 mM) を含む液 3 ml を分子量 1 万以上をカットオフする限外ろ過膜を装着した連続限外ろ過装置のセルに入れ、7.5 mM のアセチルリン酸を含む基質液を 1 ml/hr の流速で流したところ、膜を通過してくる流出液中に 0.27 mM のグルコース-6-リン酸が含まれており、その濃度は 6 時間の連続限外ろ過においてほぼ一定であった。流出液の全量は 60 ml であり、セル内液の 20 倍だけ流して、なおかつグ

ルコース-6-リン酸がコンスタントに生産されることが明らかとなった。

特開 昭53-133283 図

特許出願人 工業技術院長 窪田 雅 男
指定代理人 工業技術院微生物工業技術研究所長
御 廣 光 信